

DOCKET NO.: 196737U PCT

09/622915  
533 Rec'd PCT/TO 07 SEP 2000

**IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE**

- IN RE APPLICATION OF: Eiichi NAKAMURA, et al.

SERIAL NO.: NEW U.S. PCT APPLICATION

FILED: HEREWITH

INTERNATIONAL APPLICATION NO.: PCT/JP99/01146

INTERNATIONAL FILING DATE: 10 March 1999

FOR: FULLERENE DERIVATIVE

**REQUEST FOR PRIORITY UNDER 35 U.S.C. 119**  
**AND THE INTERNATIONAL CONVENTION**

Assistant Commissioner for Patents  
Washington, D.C. 20231

Sir:

In the matter of the above-identified application for patent, notice is hereby given that the applicant claims as priority:

<u>COUNTRY</u>	<u>APPLICATION NO</u>	<u>DAY/MONTH/YEAR</u>
JAPAN	10/58614	10 March 1998

Certified copies of the corresponding Convention application(s) were submitted to the International Bureau in PCT Application No. **PCT/JP99/01146**. Receipt of the certified copy(s) by the International Bureau in a timely manner under PCT Rule 17.1(a) has been acknowledged as evidenced by the attached PCT/IB/304.

Respectfully submitted,  
OBLON, SPIVAK, McCLELLAND,  
MAIER & NEUSTADT, P.C.



Norman F. Oblon  
Attorney of Record  
Registration No. 24,618  
Surinder Sachar  
Registration No. 34,423



**22850**

(703) 413-3000  
Fax No. (703) 413-2220  
(OSMMN 1/97)

12-1-1964



12-1-1964

09/622915

PCT/JP 99/01146

EJU 10.03.99

日本国特許庁

PATENT OFFICE  
JAPANESE GOVERNMENT

REC'D 26 APR 1999

WIPO PCT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日

Date of Application:

1998年 3月10日

出願番号

Application Number:

平成10年特許願第058614号

出願人

Applicant(s):

中村 栄一

藤沢薬品工業株式会社

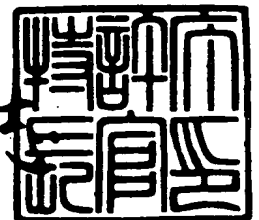
PRIORITY  
DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

1999年 4月16日

特許庁長官  
Commissioner,  
Patent Office

伴佐山 建志



出証番号 出証特平 1.1-3022838

【書類名】 特許願

【整理番号】 FP04759-00

【提出日】 平成10年 3月10日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 C07C 219/02

【発明の名称】 フラーレン誘導体

【請求項の数】 21

【発明者】

【住所又は居所】 東京都文京区本駒込 5-3-3-1001

【氏名】 中村 栄一

【発明者】

【住所又は居所】 東京都文京区本駒込 4-38-1-202

【氏名】 澤村 正也

【発明者】

【住所又は居所】 東京都文京区本郷 4-12-13-203

【氏名】 磯部 寛之

【特許出願人】

【識別番号】 597017258

【氏名又は名称】 中村 栄一

【特許出願人】

【識別番号】 000005245

【氏名又は名称】 藤沢薬品工業株式会社

【代表者】 藤山 朗

【代理人】

【識別番号】 100079670

【弁理士】

【氏名又は名称】 関 英男

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 016621

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9107308

【ブルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 フラーレン誘導体

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 DNA凝縮を目的として使用される、1ないし4本の、含窒素親水性側鎖を有するフラーレン誘導体またはその塩類。

【請求項 2】 含窒素親水性側鎖が、「窒素原子を1ないし10個その構成原子として含有する、直鎖状または分枝鎖状の、炭素数2ないし30個からなる基を1または2個その置換分として有し、フラーレン上に存在する2ないし8個の内の1または2個の $sp^3$ 炭素原子に結合する構造を有する炭化水素基」（但し、2以上の含窒素親水性側鎖間をつなぐアルキレン基からなる架橋部位が存在してもよい）である請求項1に記載のDNA凝縮を目的として使用されるフラーレン誘導体またはその塩類。

【請求項 3】 含窒素親水性側鎖を、1または2本有する、請求項2に記載のDNA凝縮を目的として使用されるフラーレン誘導体またはその塩類。

【請求項 4】 含窒素親水性側鎖が、「窒素原子を2ないし8個その構成原子として含有する、直鎖状または分枝鎖状の炭素数2ないし20個からなる基を1または2個その置換分として有し、フラーレン上に存在する2ないし8個の内の2個の $sp^3$ 炭素原子に結合する構造を有する炭化水素基」（但し、2本の含窒素親水性側鎖間をつなぐアルキレン基からなる架橋部位が存在してもよい）である請求項3に記載のDNA凝縮を目的として使用されるフラーレン誘導体またはその塩類。

【請求項 5】 1ないし4本の、含窒素親水性側鎖を有するフラーレン誘導体またはその塩類の、DNA凝縮を目的とする使用。

【請求項 6】 請求項5において、含窒素親水性側鎖が、「窒素原子を1ないし10個その構成原子として含有する、直鎖状または分枝鎖状の、炭素数2ないし30個からなる基を1または2個その置換分として有し、フラーレン上に存在する2ないし8個の内の1または2個の $sp^3$ 炭素原子に結合する構造を有する炭化水素基」（但し、2以上の含窒素親水性側鎖間をつなぐアルキレン基からなる架橋部位が存在してもよい）であるフラーレン誘導体またはその塩類の、DNA

凝縮を目的とする使用。

【請求項 7】 請求項 6 において、含窒素親水性側鎖を、1 または 2 本有する、フラーレン誘導体またはその塩類の、DNA 凝縮を目的とする使用。

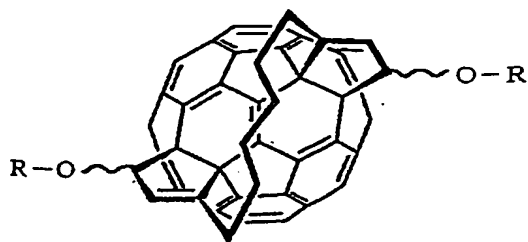
【請求項 8】 請求項 7 において、含窒素親水性側鎖が、「窒素原子を 2 ないし 8 個その構成原子として含有する、直鎖状または分枝鎖状の炭素数 2 ないし 20 個からなる基を 1 または 2 個その置換分として有し、フラーレン上に存在する 2 ないし 8 個の内の 2 個の  $sp^3$  炭素原子に結合する構造を有する炭化水素基」（但し、2 本の含窒素親水性側鎖間をつなぐアルキレン基からなる架橋部位が存在してもよい）であるフラーレン誘導体またはその塩類の、DNA 凝縮を目的とする使用。

【請求項 9】 1 ないし 4 本の、含窒素親水性側鎖を有するフラーレン誘導体またはその塩類により形成される DNA 凝縮体。

【請求項 10】 DNA のベースペア数とフラーレン誘導体またはその塩類の分子数の比が、4 : 1 から 1 : 2 である請求項 9 に記載の DNA 凝縮体。

【請求項 11】 以下の一般式：

【化 1】

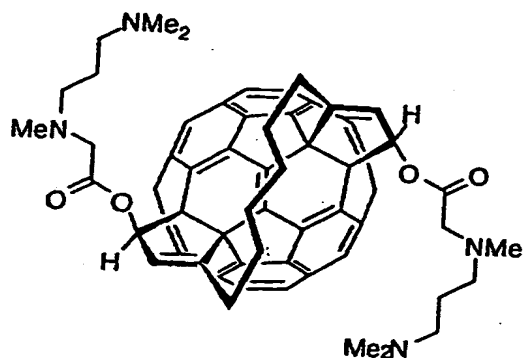


〔式中、2 つの R は、同一または異なって、窒素原子を 1 ないし 10 個その構成原子として含有する、直鎖状または分枝鎖状の、炭素数 2 ないし 30 個からなるアシル基または水素をそれぞれ意味する（但し、2 つの R は同時には水素ではない）〕

で示されるフラーレン誘導体またはその塩類。

但し、以下の構造式で示されるフラーレン誘導体を除く。

【化 2】

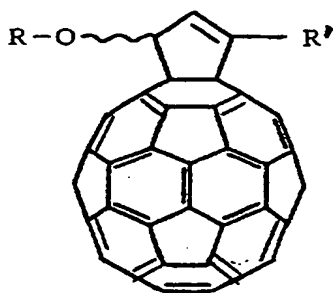


【請求項 1 2】 2つのRが、同一または異なって、窒素原子を2ないし8個その構成原子として含有する、直鎖状または分枝鎖状の、炭素数2ないし20個からなるアシル基である請求項 1 1に記載のフラーレン誘導体またはその塩類。

【請求項 1 3】 2つのRが、同一または異なって、[N-(N, N-ジ(低級)アルキルアミノ)(低級)アルキル-N-(低級)アルキル]アミノ(低級)アルカノイル基である請求項 1 2に記載のフラーレン誘導体またはその塩類。

【請求項 1 4】 以下の一般式：

【化 3】



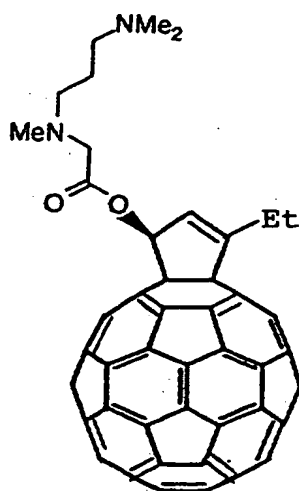
【式中、Rは、窒素原子を1ないし10個その構成原子として含有する、直鎖状または分枝鎖状の、炭素数2ないし30個からなるアシル基、および、R'は水素または低級アルキル基をそれぞれ意味する】

で示されるフラーレン誘導体またはその塩類。

但し、以下の構造式で示されるフラーレン誘導体を除く。



【化 4】



【請求項 15】 R が、窒素原子を 2 ないし 8 個その構成原子として含有する、直鎖状または分枝鎖状の、炭素数 2 ないし 20 個からなるアシル基である請求項 14 に記載のフラレン誘導体またはその塩類。

【請求項 16】 R が、[N-(N, N-ジ(低級)アルキルアミノ)(低級)アルキル-N-(低級)アルキル]アミノ(低級)アルカノイル基である請求項 15 に記載のフラレン誘導体またはその塩類。

【請求項 17】 1 ないし 4 本の、含窒素親水性側鎖を有するフラレン誘導体またはその塩類からなる DNA 凝縮剤。

【請求項 18】 含窒素親水性側鎖が、「窒素原子を 1 ないし 10 個その構成原子として含有する、直鎖状または分枝鎖状の、炭素数 2 ないし 30 個からなる基を 1 または 2 個その置換分として有し、フラレン上に存在する 2 ないし 8 個の内の 1 または 2 個の  $sp^3$  炭素原子に結合する構造を有する炭化水素基」(但し、2 以上の含窒素親水性側鎖間をつなぐアルキレン基からなる架橋部位が存在してもよい)である請求項 17 に記載のフラレン誘導体またはその塩類からなる DNA 凝縮剤。

【請求項 19】 含窒素親水性側鎖を、1 または 2 本有する、請求項 18 に記載のフラレン誘導体またはその塩類からなる DNA 凝縮剤。

【請求項 20】 含窒素親水性側鎖が、「窒素原子を 2 ないし 8 個その構成原子

として含有する、直鎖状または分枝鎖状の炭素数 2 ないし 20 個からなる基を 1 または 2 個その置換分として有し、フラーレン上に存在する 2 ないし 8 個の内の 2 個の  $sp^3$  炭素原子に結合する構造を有する炭化水素基」(但し、2 本の含窒素親水性側鎖間をつなぐアルキレン基からなる架橋部位が存在してもよい)である請求項 19 に記載のフラーレン誘導体またはその塩類からなる DNA 凝縮剤。

【請求項 21】 1 ないし 4 本の、含窒素親水性側鎖を有するフラーレン誘導体またはその塩類の、DNA 凝縮剤の製造を目的とする使用。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、DNA の凝縮能力を有し、例えば、DNA 凝縮試薬として有用なフラーレン (fullerene) 誘導体に関するものであり、例えば、医薬品産業の分野で有用である。

【0002】

【発明の解決しようとする課題】

染色体上での DNA の配列で例示されるようなタンパク-DNA 複合体における DNA の凝縮 (compaction) は極めて重要な生物化学的課題である。有機小分子や無機イオンによる凝縮もトランスフェクション (transfection) に関連して重要な研究課題である (例えば、Yoshikawa, Y. et al, FEBS Letters, 1996, vol. 396, 71-76; Behr, J-P, Acc. Chem. Res., 1993, vol. 26, 274-278; 等を参照)。

本発明は、新たな DNA 凝縮のための手段を提供せんとするものである。

【0003】

【課題を解決するための手段】

現在までにフラーレンをその目的に応じて種々化学的に修飾する方法が提供され、種々のフラーレン誘導体が合成されて来た (例えば、Friedman, S. H. et al, J. Am. Chem. Soc., 1993, vol. 115, 6506-6509; Yamago, S. et al, J. Am. Chem. Soc., 1994, vol. 116, 1123; Taki, M. et al, J. Am. Chem. Soc., 1997, vol. 119, 926; An, Y. Z. et al, Tetrahedron, 1996, vol. 52, 5179-

5189; Nakamura, E. et al, Bull. Chem. Soc. Jpn., 1996, vol. 69, 2143-2151; Yamago, S. et al, Chemistry Letters, 1996, 395-396; Murata, Y. et al, The 2nd International Forum on Chemistry of Functional Organic Chemicals (IFOC-2), 1997, P-31, Tokyo, Japan, 等を参照)。

本発明者らは、かかるフラーレン誘導体の内、1ないし4本の、含窒素親水性側鎖を有するフラーレン誘導体またはその塩類が、両親媒性で極めて優れたDNAの凝縮能力を有することを見出し本発明を完成した。

#### 【0004】

##### 【発明実施の形態】

##### 1. 本発明のフラーレン誘導体の構造

本発明のフラーレン誘導体は、「1ないし4本の、含窒素親水性側鎖を有するフラーレン誘導体」である。このフラーレン誘導体には、新規な化合物ならびに公知の化合物の両者が含まれる。

本発明のフラーレン誘導体のDNAの凝縮能力は、フラーレンの大きさ、疎水性と、含窒素親水性側鎖のリン酸基への親和性との共同的作用によるものである。フラーレンがDNAの疎水性部分（例えば、DNAの主溝）と、含窒素親水性側鎖がDNAのリン酸基とそれぞれ相互作用することによりDNA単分子が折り畳まれ、さらには、多数のこの折り畳まれたDNA単分子の疎水性部分が集合することで、かかる凝縮が生じるものと考えられる。

#### 【0005】

従って、フラーレン誘導体の分子設計はこの点を考慮して当業者であれば適宜為し得るものである。合成されたフラーレン誘導体のDNAの凝縮能力は、フラーレン誘導体とDNA（例えば、プラスミドDNA）の混合溶液を電気泳動し、泳動されるDNAの量を蛍光発光写真により測定することで評価し得る。また、この凝縮作用はフラーレン誘導体がDNAに対し高い結合能力を持つことと深くかかわるため、例えば、牛胸腺DNAへのエチジウム ブロミドとの競合結合実験によりスクリーニングすることが可能である。

#### 【0006】

フラーレン誘導体は、その塩類の形で用いることもできるが、この場合の塩類

としては、慣用の無毒性の塩であって、とりわけ医薬として許容される塩が好ましい。具体的には、無機酸付加塩（例えば、塩酸塩、臭化水素酸塩、硫酸塩、リン酸塩、等）、有機カルボン酸またはスルホン酸付加塩（例えば、蟻酸塩、酢酸塩、トリフルオロ酢酸塩、マレイン酸塩、酒石酸塩、フマル酸塩、メタンスルホン酸塩、ベンゼンスルホン酸塩、トルエンスルホン酸塩、等）、塩基性または酸性アミノ酸（例えば、アルギニン、アスパラギン酸、グルタミン酸、等）との塩を挙げることができる。

## 【0007】

フラーレン誘導体には不斉炭素原子の存在や分子不斉の存在により、種々の異性体が存在し得るが、そのいずれも本発明のフラーレン誘導体に含まれる。

本発明のフラーレン誘導体における「フラーレン」には、C60フラーレンのみならず、高次フラーレン（例えば、C70フラーレン、等）も含まれる。

## 【0008】

好適な「含窒素親水性側鎖」としては、「窒素原子を1ないし10個その構成原子として含有する、直鎖状または分枝鎖状の、炭素数2ないし30個からなる基を1または2個その置換分として有し、フラーレン上に存在する2ないし8個の内の1または2個の $sp^3$ 炭素原子に結合する構造を有する炭化水素基」が挙げられ、より好ましくは「窒素原子を2ないし8個その構成原子として含有する、直鎖状または分枝鎖状の炭素数2ないし20個からなる基を1または2個その置換分として有し、フラーレン上に存在する2ないし8個の内の2個の $sp^3$ 炭素原子に結合する構造を有する炭化水素基」が挙げられる。

## 【0009】

当該「含窒素親水性側鎖」におけるアミノ基は、1級、2級または3級アミノ基のいずれでもよく、窒素原子を含む複素環〔例えば、窒素原子1ないし4個を有する3ないし8員（好ましくは、5または6員）の不飽和複素単環基（例えば、ピロリル、ピロリニル、イミダゾリル、ピラゾリル、ピリジル、ジヒドロピリジル、ピリミジル、ピラジニル、ピリダジニル、トリアゾリル、テトラゾリル、等）；窒素原子1ないし4個を含む不飽和縮合複素環基（例えば、インドリル、イソインドリル、インドリジニル、ベンズイミダゾリル、キノリル、イソキノリ

ル、インダゾリル、ベンゾトリアゾリル、アクリジニル、等)等]を形成していてもよい。また、必要により低級アルキル基等により置換されていてもよい。

なお、当該「含窒素親水性側鎖」は酸素原子、イオウ原子等の他のヘテロ原子を、その構成原子として、および／または、その置換分として、有していてもよい。

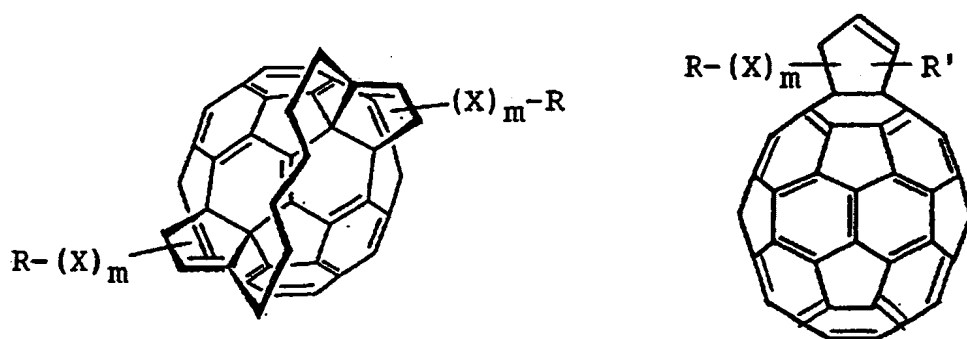
さらには、2以上の「含窒素親水性側鎖」がある場合には、各「含窒素親水性側鎖」間を繋ぐアルキレン基からなる架橋部位があってもよい。

「含窒素親水性側鎖」における「炭化水素基」には、飽和または不飽和の、直鎖状、分岐状または環状の炭化水素基が含まれ、好ましいものは、炭素数1ないし20個（より好ましくは1ないし15個）を有する炭化水素基である。

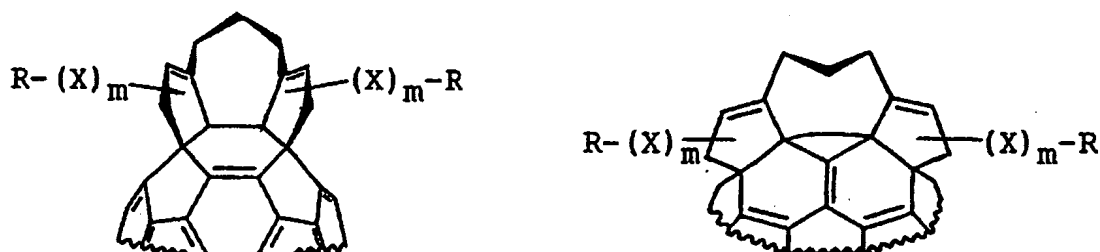
【0010】

当該「含窒素親水性側鎖」の具体的構造としては、以下のようなものが例示される（フラーレン部分も示されている）。

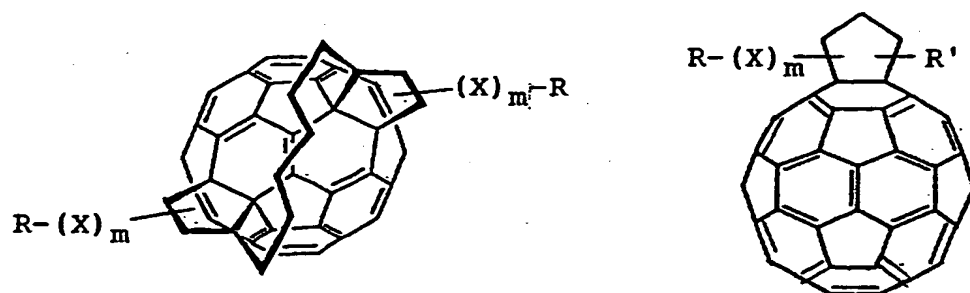
【化5】



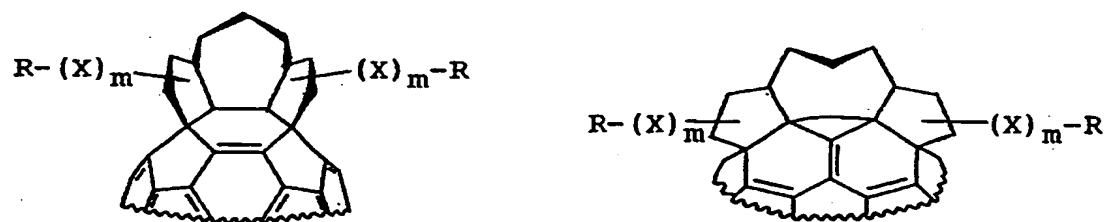
【化6】



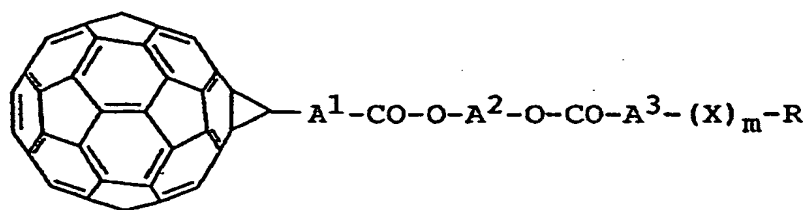
【化 7】



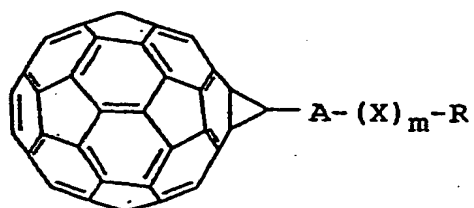
【化 8】



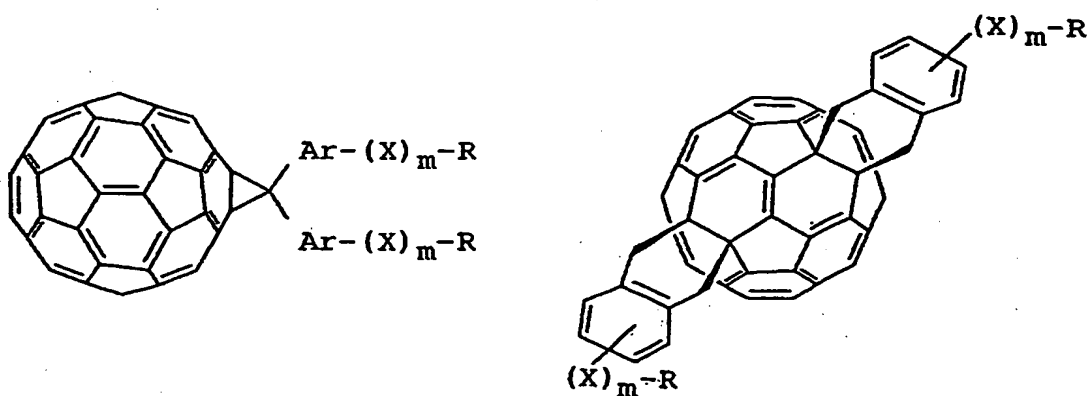
【化 9】



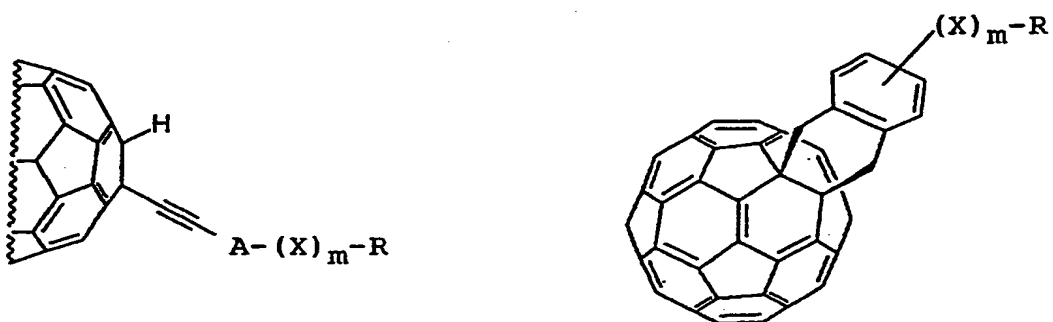
【化 10】



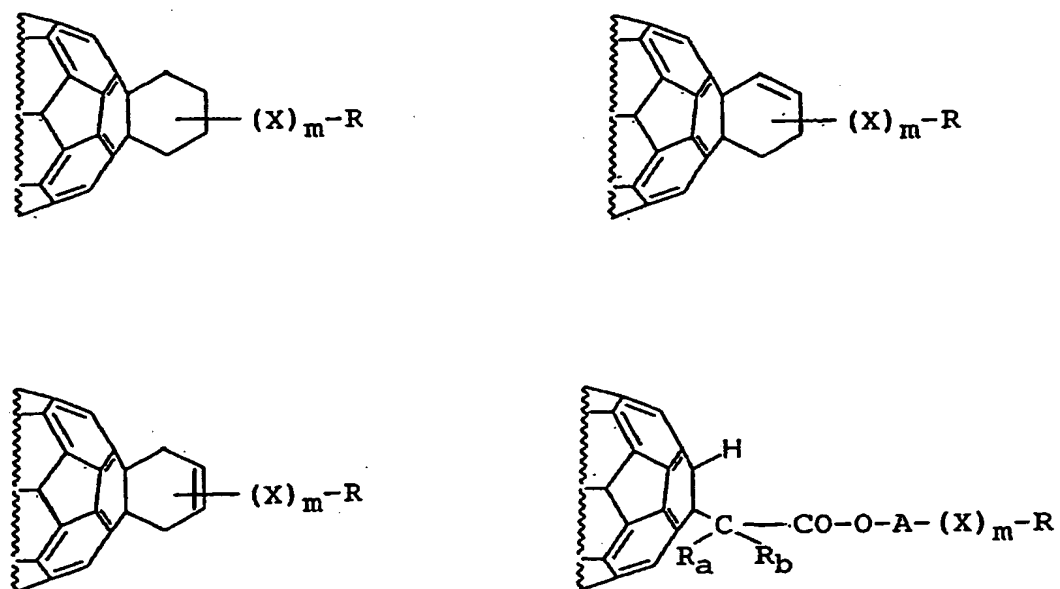
【化 1 1】



【化 1 2】



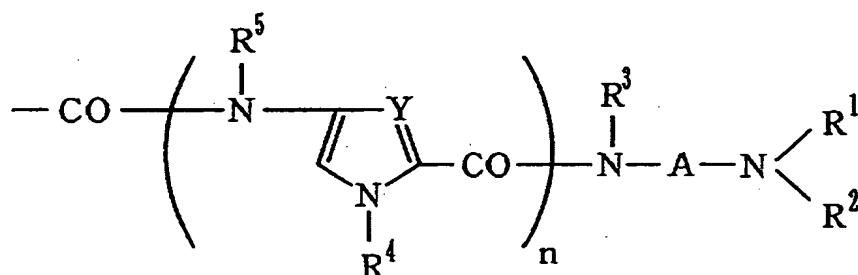
【化 1 3】



上記式中、Rは、同一または異なって、窒素原子を1ないし10個その構成原子として含有する、直鎖状または分枝鎖状の、炭素数2ないし30個からなるアルキル基〔より好ましくは、〔N-（N，N-ジ（低級）アルキルアミノ）（低級）アルキル-N-（低級）アルキル〕アミノ（低級）アルカノイル基、〔N-（N-（低級）アルキルアミノ）（低級）アルキル-N-（低級）アルキル〕アミノ（低級）アルカノイル基、〔N-ピロリル（低級）アルキル-N-（低級）アルキル〕アミノ（低級）アルカノイル基、〔N-（N，N-ジ（低級）アルキルアミノ）（高級）アルキル-N-（低級）アルキル〕アミノ（低級）アルカノイル基、〔N-（N-（低級）アルキルアミノ）（低級）アルキル-N-（低級）アルキル〕アミノ（高級）アルカノイル基、〔N-ピロリル（高級）アルキル-N-（低級）アルキル〕アミノ（高級）アルカノイル基、または、式：

【0011】

【化14】



【0012】

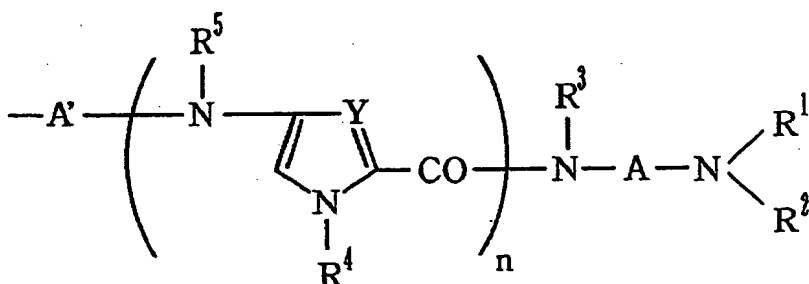
（式中、R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>、R<sup>3</sup>、R<sup>4</sup>およびR<sup>5</sup>は、同一または異なって、水素または低級アルキル基、Aはアルキレン基、YはCHまたはN、およびnは1ないし4の整数を意味する）で示される基等が挙げられる。〕、または、窒素原子を1ないし10個その構成原子として含有する、直鎖状または分枝鎖状の、炭素数2ないし30個からなるアルキル基〔より好ましくは、〔N-（N，N-ジ（低級）アルキルアミノ）（低級）アルキル-N-（低級）アルキル〕アミノ（低級）アルキル基、〔N-（N-（低級）アルキルアミノ）（低級）アルキル-N-（低級）アルキル〕アミノ（低級）アルキル基、〔N-ピロリル（低級）アルキル-N-（低級）アルキル〕アミノ（低級）アルキル基、〔N-（N，N-ジ（低級）



アルキルアミノ) (高級) アルキル-N-(低級) アルキル] アミノ (低級) アルキル基、[N-(N-(低級) アルキルアミノ) (低級) アルキル-N-(低級) アルキル] アミノ (高級) アルキル基、[N-ピロリル (高級) アルキル-N-(低級) アルキル] アミノ (高級) アルキル基)、または、式:

【0013】

【化15】



【0014】

(式中、 $R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^3$ 、 $R^4$ 、 $R^5$ 、 $A$ 、 $Y$ および $n$ はそれぞれ前と同じ意味であり、 $A'$  はアルキレン基を意味する) で示される基等が挙げられる。]

$Ar$ はアリール基 (例えば、フェニル、ナフチル、アントリル、等)、

$R'$  は、水素または低級 アルキル基、

$Ra$ と $Rb$ とは、同一または異なって、水素または低級アルキル基を意味するか、もしくは、両者は一体となって、結合する炭素原子とともに3ないし6員のシクロアルキル基を形成してもよい基、

$A$ 、 $A^1$ 、 $A^2$ および $A^3$ は、同一または異なって、アルキレン基、

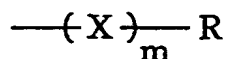
$X$ は $-O-$ 、 $-N-$ または $-S-$ 、および、

$m$ は0または1の整数をそれぞれ意味する。

【0015】

但し、以上の「含窒素親水性側鎖」はあくまでも一例であり、「フラーレン」と「式

【化 16】



で示される基」とでは含まれた部分の構造としては、上記以外の公知の構造を採用することもできる。

ここで、「低級アルキル基」または「低級アルキル部分」としては、炭素原子 1 ないし 6 個を有する直鎖または分岐状のもの、例えば、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、イソブチル、第 2 級ブチル、第 3 級ブチル、ペンチル、イソペンチル、第 3 級ペンチル、ネオペンチル、ヘキシル、イソヘキシル、等を挙げることができる。

【0016】

「アルキレン基」としては、炭素数 1 から 10 個を有する直鎖または分岐状のもの、例えば、メチレン、エチレン、トリメチレン、2-メチルトリメチレン、テトラメチレン、エチルエチレン、ペンタメチレン、3-メチルペンタメチレン、ヘキサメチレン、2-エチルテトラメチレン、ヘプタメチレン、オクタメチレン、ノナメチレン、デカメチレン、等を挙げることができる。

【0017】

また、「高級アルキル基」または「高級アルキル部分」としては、炭素原子 7 ないし 20 個を有する直鎖または分岐状のもの、例えば、ヘプチル、オクチル、2-エチルヘキシル、ノニル、デシル、3, 7-ジメチルオクチル、ウンデシル、ドデシル、トリデシル、テトラデシル、ペンタデシル、3-メチル-10-エチルドデシル、ヘキサデシル、ヘプタデシル、オクタデシル、ノナデシル、イコシル、等を挙げることができる。

【0018】

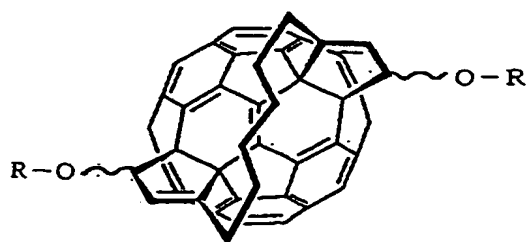
フラーレン上の「含窒素親水性側鎖」の数は、1 ないし 4 本が好適であるが、1 本鎖または 2 本鎖の場合が特に好ましい。1 本鎖の場合は比較的含窒素数の多いもの（好ましくは窒素数 4 個以上）を有するものを選ぶのが有利であり、とりわけ、比較的高い結合能を持つポリピロール類が好ましい。また、側鎖が 2 本あ

る場合は、窒素原子数 2 ないし 8 個の比較的親水性が低いアルキルポリアミンが好ましい。

【0019】

以上説明されたフラーレン誘導体の中で好ましいものは、合成上の容易さやその DNA への結合能力の強さ等の諸要素で適宜選択されるものであるが、現在までの知見で好ましいものとしては、以下の一般式 (I) で示されるものが挙げられる。

【化 17】



[式中、2つの R は、同一または異なって、窒素原子を 1 ないし 10 個その構成原子として含有する、直鎖状または分枝鎖状の、炭素数 2 ないし 30 個からなるアシル基または水素をそれぞれ意味する (但し、2つの R は同時には水素ではない) ] またはその塩類。

【0020】

より好ましいフラーレン誘導体としては、2つの R が、同一または異なって、窒素原子を 2 ないし 8 個その構成原子として含有する、直鎖状または分枝鎖状の、炭素数 2 ないし 30 個からなるアシル基である一般式 (I) の化合物が挙げられる。

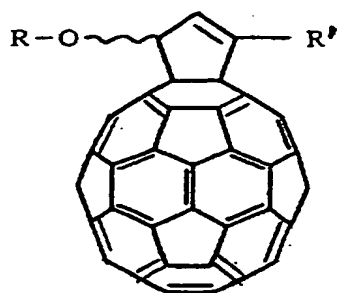
【0021】

さらに好ましいフラーレン誘導体としては、2つの R が、同一または異なって、窒素原子を 2 ないし 8 個その構成原子として含有する、直鎖状または分枝鎖状の、炭素数 2 ないし 20 個からなるアシル基である一般式 (I) の化合物が挙げられる。

【0022】

さらに、以下の一般式 (I I) :

【化 18】



【0023】

[式中、Rは窒素原子を1ないし10個その構成原子として含有する、直鎖状または分枝鎖状の、炭素数2ないし30個からなるアシル基、および、R'は水素または低級アルキル基をそれぞれ意味する]

で示されるフラーレン誘導体またはその塩類も別の好ましいフラーレン誘導体として挙げられる。

【0024】

より好ましいフラーレン誘導体としては、Rが、窒素原子を2ないし8個その構成原子として含有する、直鎖状または分枝鎖状の、炭素数2ないし30個からなるアシル基である一般式 (I I) の化合物が挙げられる。

さらに好ましいフラーレン誘導体としては、Rが窒素原子を2ないし8個その構成原子として含有する、直鎖状または分枝鎖状の、炭素数2ないし20個からなるアシル基である一般式 (I I) の化合物が挙げられる。

【0025】

## 2. 本発明のフラーレン誘導体の製造法

本発明の上記フラーレン誘導体またはその塩類は、その構造に応じて、当技術分野で公知の合成法またはそれを適宜変更して用いて合成することができる（上記ならびに後記の諸文献参照）。

以下、「含窒素親水性側鎖」を1本または2本有するフラーレン誘導体を例にとり、より具体的に本発明のフラーレン誘導体の製造法につき説明する。

## 【0026】

## 製造法A (側鎖1本)

シクロプロペノンアセタールから熱的に発生するビニルカルベン活性種とフラーレンとの文献既知の反応 (文献1. Tokuyama, H.; Isobe, H.; Nakamura, E., Bull. Chem. Soc. Jpn. 1995, vol. 68, 935-941) から得られる有機フラーレン (メタノフラーレン、プロパノフラーレン) の官能基変換により含窒素側鎖を導入することで合成される。メタノフラーレンはビニルカルベン活性種の反応後、水を加えることでケテンアセタールが加水分解され、プロパノフラーレンは水/テトラヒドロフラン/クロロベンゼン中での硫酸触媒でのアセタールの加水分解による除去、続くジイソブチルアルミニウムハイドライドによる還元後、それぞれ水酸基を持った有機フラーレンへと変換される。得られた水酸基に対し以下の官能基変換を行うと目的のフラーレン誘導体を合成できる。

## 【0027】

1. 文献既知の反応 (文献2. Nakamura, E.; Tokuyama, H.; Yamago, S.; Shiraki, T.; Sugiura, Y., Bull. Chem. Soc. Jpn. 1996, vol. 69, 2143-2151) である、無水こはく酸と水酸基を持つ有機フラーレンとのカップリング反応により、カルボン酸誘導体を得る。この得られたカルボン酸と、1級あるいは2級アミンを持つアミン化合物とのカップリングを行うことで目的の生成物を得る。

ここで、アミン化合物としては、例えば、文献2に記載のあるネトロプシン誘導体を導入したものと類似のポリピロール誘導体、あるいは、アルキルスベルミン等のポリアミン類、さらには、DNA塩基対間にインターカレート可能なアクリジン等を用いることができる。

## 【0028】

2.  $\alpha$ -ハロ酸ハライドと水酸基を持つ有機フラーレンとをカップリングさせ (文献3. Boutorine, A.S.; Tokuyama, H.; Takasugi, M.; Isobe, H.; Nakamura, E.; Helene, C., Angew. Chem., Int. Ed. Engl., 1994, vol.33, 2462-2465; 文献4. An, Y.Z.; Chen, C.H.B.; Anderson, J.L. Sigman; D.S. Foote, C.S.; Rubin, Y., Tetrahedron, 1996, vol. 52, 5179-5189)、 $\alpha$ -ハロカルボニル

化合物を得る。この得られたハライドと先と同様の 1 級あるいは 2 級アミンを持つアミン化合物とのカップリングを行うことで目的の生成物を得る。

ここで、アミン化合物としては、前記のものを用いることができる。

これらの手法は文献既知の水酸基を持つフラーレン誘導体（上記文献 4. ; 文献 5. Tokuyama, H.; Yamago, S.; Nakamura, E.; Shiraki, T.; Sugiura, Y., J. Am. Chem. Soc., 1993, vol. 115, 7918-7919）について共通に応用可能である。

#### 【0029】

##### 製造法 B（側鎖 2 本）

上述の製造法 A の手法に併せ、ビスシクロプロペノンアセタールとフラーレンとの文献既知の反応（文献 6. Isobe, H.; Tokuyama, H.; Sawamura, M.; Nakamura, E., J. Org. Chem., 1997, vol. 62, 5034-5041）から得られる有機フラーレン（ビスプロパノフラーレン）の官能基変換により親水性残基の導入を行うことで、さらに効果的な DNA 凝縮能を持つフラーレン誘導体が合成される。官能基変換は先と同様に、ビスプロパノフラーレンを水／テトラヒドロフラン／クロロベンゼン中での硫酸触媒でのアセタールの加水分解による除去、続くジイソプチルアルミニウムハイドライドによる還元後、二つの水酸基を持った有機フラーレンへと変換される。この時、立体異性体を含め、8 種の異性体の混合物が得られるが、混合物について前述と同様の官能基変換を行うことで目的のフラーレン誘導体を合成できる。

#### 【0030】

1. 無水こはく酸と水酸基を持つ有機フラーレンとをカップリングさせ、カルボン酸誘導体を得る。この得られたカルボン酸と 1 級あるいは 2 級アミンを持つアミン化合物とのカップリングを行うことで目的の生成物を得る。

アミン化合物としては、前記のものを用いることができる。

#### 【0031】

2.  $\alpha$ -ハロ酸ハライドと二つの水酸基を持つ有機フラーレンとをカップリングさせ、 $\alpha$ -ハロカルボニル化合物を得る。この時、用いる  $\alpha$ -ハロ酸ハライドとしては  $\alpha$ -ブロモアセチルブロミドが知られているが、ハライドとしてはクロリ

ドおよびブロミド共に適用可能であり、さらに $\alpha$ 位に置換基を持つものでも可能である。有機フラーレンとしてはC<sub>2</sub>対称性を持つ誘導体について報告があるが(文献7. Isobe, H.; Sawamura, M.; Nakamura, E., 13th Fullerene Symposium, 1997, 2-20, Nagano, Japan)、上記文献6に記載された対称性の異なる有機フラーレンを、あるいは、ジイソブチルアルミニウムハイドライド還元で得られる異性体の混合物を用いることで同等あるいはそれ以上の活性が得られる。得られたハライドと、先と同様の1級あるいは2級アミンを持つアミン化合物とのカップリングを行うことで目的の生成物を得る。

ここで、アミン化合物としては、前記のものを用いることができる。

これらの手法は文献既知の複数の水酸基を持つフラーレン誘導体(文献8. Taki, M.; Sugita, S.; Nakamura, Y.; Kasashima, E.; Yashima, E.; Okamoto, Y.; Nishimura, J., J. Am. Chem. Soc., 1997, vol. 119, 926)について共通に適用可能である。

#### 【0032】

当業者であれば、本明細書に引用された諸文献の開示、その他の公知技術、ならびに製造法AおよびBに関する具体的開示もしくは後述の実施例を参酌して、所望の構造を有する本発明のフラーレン誘導体を製造することができる。

#### 【0033】

### 3. 本発明のフラーレン誘導体の使用態様

本発明のフラーレン誘導体は、両親媒性の化合物であり、優れたDNAの凝縮能力を有している。本発明のフラーレン誘導体を、DNAに作用させると、そのDNAへの結合能力に基づき、DNAは分子内の2重鎖間の結合作用により、単分子DNAは曲げられ折り畳まれる。さらに分子間での結合作用によりDNA凝縮体を生成する。この凝縮体形成はフラーレン誘導体の濃度に関して可逆的であり、フラーレン誘導体を抽出して除くとDNAが再生する。

このことは、プラスミドpBR322に対して種々の濃度で後記の「テトラアミン化合物」を作用させたサンプルを、アガロース電気泳動実験ならびにAFM顕微鏡による形態観察に付すことで確認されている。以下、この点につき具体的な試験データにより説明する。

【0034】

#### 試験化合物

後記の実施例1で得られたフラーレン誘導体（以下、「テトラアミン化合物」という）を試験に供した。

【0035】

#### 電気泳動実験方法

電気泳動は、Short Protocols in Molecular Biology 3rd Ed., 1992, Wiley, 2-13に記載の方法に従った。

試験サンプルとしては、プラスミド pBR322 ( $25\mu\text{g/mL}$ ) と「テトラアミン化合物」の所定量を20% THF/HEPES-Mg緩衝液 ( $20\mu\text{L}$ ) に溶解したものをを用いた。このサンプルを25℃で5分間インキュベートした後、アガロースゲル上に展開した。0.25% (w/v) プロモフェノール ブルーおよび50% (v/v) グリセロールを含む緩衝液 ( $5\mu\text{L}$ ) で展開した。電気泳動は、エチジウム ブロミド ( $0.5\text{mg/mL}$ ) を含む1% (w/v) アガロースゲルのTBE緩衝液中溶液を用いて行った。蛍光発光写真のIOD (integrated optical density) は、NIH イメージ プログラム v1.60により測定した。これにより、泳動されたDNAの量を測定した。

【0036】

#### 実験結果

詳細は図1に示す。

【0037】

「テトラアミン化合物」の濃度依存性で、相転移現象が起こった。即ち、アガロース電気泳動により泳動されるDNAは、DNAのベースペア数に対するフラーレン誘導体分子数比が1/1で急速に減少し、1/2.6で完全になくなった。

【0038】

電気泳動に用いたサンプルの水薄膜中でのAMF顕微鏡での観察でも、相転移の前後で全く異なるAMF像が見られた。相転移前から、DNAの凝縮が始まり



、相転移後は多分子凝縮体は疎水性の集合体となっていることが確認された。

以上の実験結果からは、完全なDNA凝縮体を形成するためには、DNAのベースペア数に対するフラーレン誘導体分子数比が、4 : 1 から 1 : 2 の範囲であることが望ましいと考えられる。

#### 【0039】

なお、ここでの、フラーレン誘導体によるDNA凝縮体の形成は、例えば、適当な緩衝液中で両者を混合することで行われるが、これに限定されず当技術分野で通常用いられる方法により行うことができる。また、相転移したDNA溶液をエタノール沈殿処理等の常法により処理することで、DNA凝縮体を単離することもできる。さらに、フラーレン誘導体の添加により凝縮を起こしたDNA溶液から、クロロホルム等の有機溶媒でフラーレン誘導体を抽出することで、もとのDNAを再生することもできる。

前述のように、フラーレン誘導体のDNA凝縮能力は、DNAに対する高い結合能力と深くかかわっている。参考までに、前記「テトラアミン化合物」に関する試験結果を示す。

#### 【0040】

##### 試験方法

DNAの凝縮能力は、牛胸腺DNAへのエチジウム ブロミドとの競合結合実験により評価された。この競合結合実験の方法は、ジャーナル・オブ・メディシナル・ケミストリー、21巻、658-668頁(1978年)に記載されたものを用いた。

#### 【0041】

##### 試験結果

「テトラアミン化合物」は1.9  $\mu$ Mの濃度でエチジウム ブロミドの50%置換を起こした。

なお、この試験結果は、本発明を実施する上で特に好ましいフラーレン誘導体の分子設計を行う際の目安となるものであり、適宜合成されたフラーレン誘導体のDNAへの結合能力が上記の化合物と同等もしくはそれ以上のものが本発明を実施する上でとりわけ望ましいと考えられる。

【0042】

本発明のフラレン誘導体が、単にDNAへの結合能力を有するのみでなく、さらに進んで多分子のDNAを凝縮させる能力を有するとの知見は全く新たなものである。

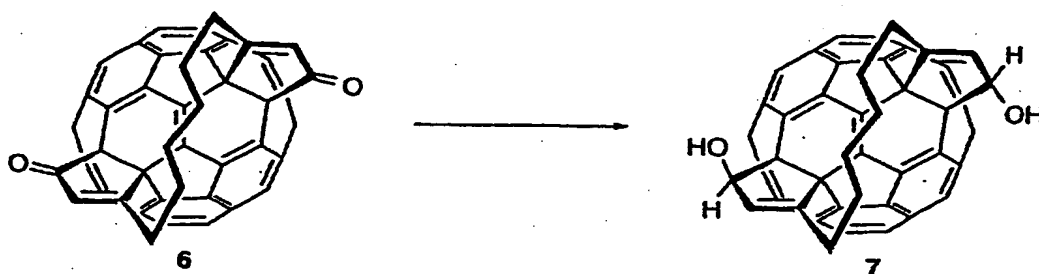
従って、本発明における「DNA凝縮を目的として（とする）使用」する態様ならびに「DNA凝縮剤」としての使用態様には、以上説明された本発明のフラレン誘導体の有するDNAの凝縮能力を利用したあらゆる使用形態が含まれ、例えばDNA凝縮試薬としての使用；ベクターの細胞内への導入のための使用；アンチセンスDNA（またはその誘導体）やデコイDNA（またはその誘導体）等のDNA（またはその誘導体）断片の細胞内への導入のための使用；プロモーターやエンハンサー領域等への結合に基づく遺伝子の発現制御のための使用；二重鎖DNAから一重鎖DNAへの転換を抑制することによる細胞周期調節のための使用；一重鎖DNAから二重鎖DNAへの、もしくは、二重鎖DNAから一重鎖DNAへのメルティングポイントを調節することによるPCRの効率の調節のための使用；等の態様が含まれ、遺伝子治療への応用も可能である。

フラレン誘導体の以上の各態様での使用にあたっては、各使用態様での常法に従い、本発明のフラレン誘導体またはその塩類を、単独または組成物の形で用いることで、所期の目的を達成できる。

【0043】

【実施例】

【化19】



製造例 1

ジエノン 6 (130mg, 143  $\mu$ mol) のクロロベンゼン (130mL) 中溶液に、ジイソ

ブチルアルミニウム ハイドライド (in hexane) (0.95M, 751  $\mu$ L) を常温にてゆっくり加える。2時間攪拌後、30%ポタシウムソジウムタータレート水溶液を加え、混合物を1時間攪拌する。水による抽出処理により粗生成物を溶解性の低い黒色塊 (130mg) を得る。このようにして得られるジオール7は、C2対称性ならびにC1対称性ジアステレオマーの混合物である (約7:3)。この混合物は、さらなる精製を行うことなく、以下の反応に用いられる。

ジオール7:

$R_f=0.15$  (PhCl)

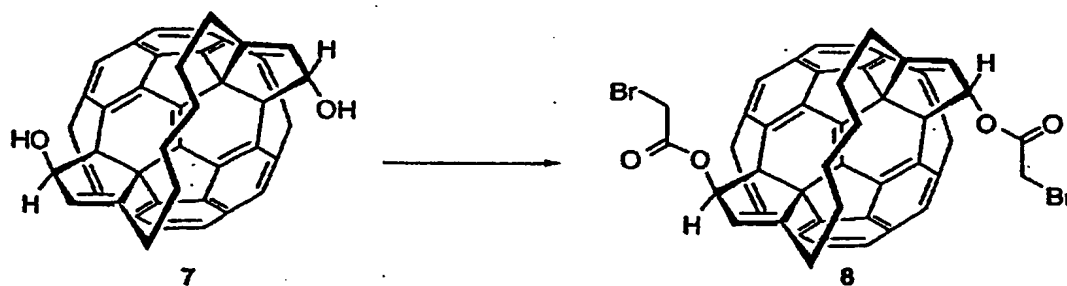
IR (KBr) 3417, 2925, 1506, 798, 694  $\text{cm}^{-1}$

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3/\text{CS}_2 1/1$ )  $\delta$  1.54-1.62 (br m, 4H,  $(\text{CH}_2)_2-(\text{CH}_2)_2-(\text{CH}_2)_2$ ), 1.76-1.88 (br m, 2H, homoallylic methylene proton), 1.88-1.99 (br m, 2H, homoallylic methylene proton), 2.28 (d, 2H,  $J=12.0$  Hz, OH), 2.65-2.80 (m, 4H, allylic methylene proton), 6.22 (br s, 2H, vinyl proton), 6.34 (br d, 2H,  $J=12.0$  Hz, allylic methylene proton)

【0044】

## 製造例2

【化20】



ジオール7 (50mg, 54.7  $\mu$ mol) のクロロベンゼン (50 mL) 中溶液にブromoアセチル ブロミド (23.7  $\mu$ L, 274  $\mu$ mol) とピリジン (22.1  $\mu$ L, 274  $\mu$ mol) を加える。6時間攪拌後、炭酸水素ナトリウムを加えて反応を終了させる。水で抽出処理をして、粗生成物を得る。シリカゲルカラムクロマトグラフィー (シリカゲル5 g, クロロベンゼンにて溶出) にて精製して、ジブロミド8 (31.6

mg, 50 %, 2 steps)を得る。

ジプロミド 8 :

$R_f=0.65$  (PhCl)

IR (KBr) 2925, 2854, 1733, 1261, 694  $\text{cm}^{-1}$

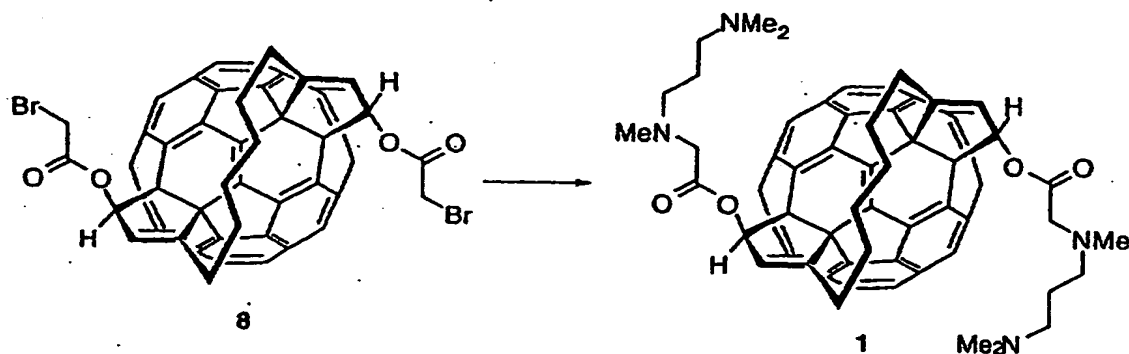
$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  1.55-1.63 (br m, 4H,  $(\text{CH}_2)_2-(\text{CH}_2)_2-(\text{CH}_2)_2$ ), 1.80-2.00 (br m, 4H, homoallylic methylene proton), 2.70-2.84 (br m, 4H, allylic methylene proton), 3.80 (d, 2H,  $J=12.0$  Hz,  $\text{BrCH}_2\text{CO}$ ), 3.84 (d, 2H,  $J=12.0$  Hz,  $\text{BrCH}_2\text{CO}$ ), 6.16 (br s, 2H, vinyl proton), 7.33 (br s, 2H, allylic methylene proton)

$^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  25.66 ( $\text{CH}_2$ ), 27.03 ( $\text{CH}_2$ ), 29.33 ( $\text{CH}_2$ ), 73.11 ( $\text{sp}^3$ , C60), 74.11 ( $\text{sp}^3$ , C60), 88.04 (allylic CH), 125.05 (vinyl CH), 127.24, 132.98, 136.38, 136.52, 138.30, 139.56, 141.79, 141.93, 142.07, 142.11, 143.14, 144.74, 144.76, 144.90, 145.32, 145.41, 145.62, 145.67, 146.01, 146.05, 146.35, 147.36, 147.61, 147.83, 148.34, 148.74, 148.98, 149.87, 152.51, 166.78 (C=O)

【0045】

# 実施例 1

【化 2 1】



ジプロミド 8 (23.1 mg, 20.0  $\mu\text{mol}$ ) のクロロベンゼン (10 mL) 中溶液に、N,

N, N'-トリメチル-1, 3-プロパンジアミン(14.7  $\mu$ L, 100  $\mu$ mol)を加える。1時間攪拌後、水による抽出処理により粗生成物を得る。ゲル透過クロマトグラフィー(JAIGEL-1H 20x600 mm and -2H 20x600 mm GPC columns, 0.5 % トリエチルアミン/クロロホルムにより溶出)により精製してテトラアミン 1 (12.2 mg, 50 %)を得る。

テトラアミン 1 :

$R_f=0.05$  ( $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{AcOH}$  85/10/5)

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  1.40-1.54 (overlapped m, 8H,  $\text{NCH}_2\text{CH}_2$  and  $(\text{CH}_2)_2-(\text{CH}_2)_2-(\text{CH}_2)_2$ ), 1.50-1.75 (br m, 2H, homoallylic methylene proton), 1.75-2.00 (br m, 2H, homoallylic methylene proton), 2.08 (overlapped s, 16H,  $\text{N}(\text{CH}_3)_2$  and  $\text{NCH}_2$ ), 2.20 (s, 6H,  $\text{NCH}_3$ ), 2.36 (t, 4H,  $J=7.4$  Hz,  $\text{NCH}_2$ ), 2.60-2.74 (br m, 4H, allylic methylene proton), 3.15 (d, 2H,  $J=17.2$  Hz,  $\text{NCH}_2\text{CO}$ ), 3.28 (d, 2H,  $J=17.2$  Hz,  $\text{NCH}_2\text{CO}$ ), 6.08 (br s, 2H, vinyl proton), 7.35 (br s, 2H, allylic methylene proton)

$^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  25.53 ( $\text{CH}_2$ ), 25.96 ( $\text{CH}_2$ ), 26.91 ( $\text{CH}_2$ ), 29.29 ( $\text{CH}_2$ ), 42.09 ( $\text{NCH}_3$ ), 45.55 ( $\text{N}(\text{CH}_3)_2$ ), 54.63 ( $\text{CH}_2$ ), 57.55 ( $\text{CH}_2$ ), 58.30 ( $\text{CH}_2$ ), 73.28 ( $\text{sp}^3$ , C60), 74.08 ( $\text{sp}^3$ , C60), 86.68 (allylic CH), 125.86 (vinyl CH), 127.24, 132.76, 136.34, 136.40, 138.19, 139.49, 141.80, 141.83, 141.86, 142.08, 143.17, 144.65, 144.73, 144.97, 145.20, 145.44, 145.46, 145.65, 145.96, 145.99, 146.29, 147.52, 147.82, 148.71, 148.91, 148.96, 150.23, 151.21, 155.30, 170.68 (C=O)

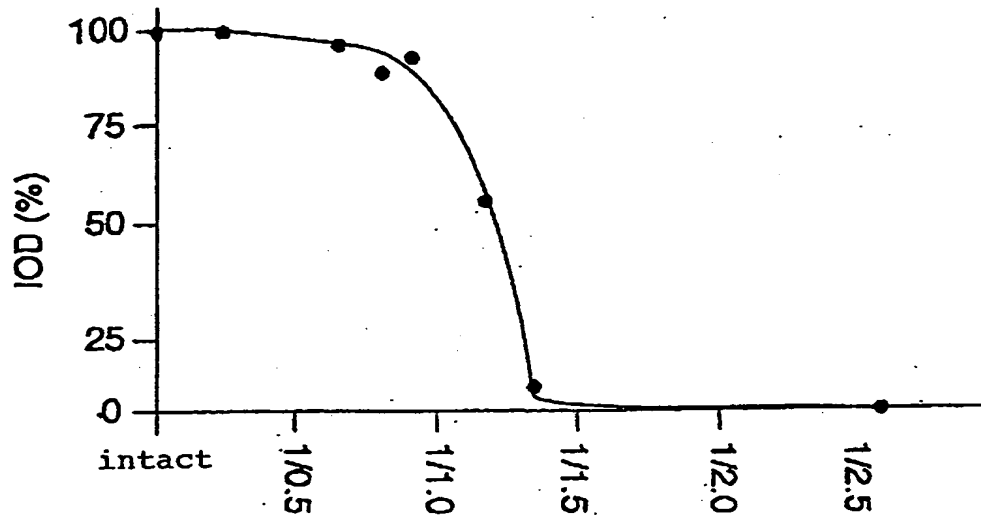
#### 【図面の簡単な説明】

【図 1】 図 1 は、「テトラアミン化合物」をアガロースゲル電気泳動実験に付した際の実験結果を示す。

縦軸は、I O D (%) を示し、横軸は、DNA のベースペア数と「テトラアミン化合物」の分子数の比を示す。

【書類名】 図面

【図 1】



DNAのベースペア数 / 「テトラアミン化合物」の分子数

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 新たなDNA凝縮のための手段を提供する。

【解決手段】 DNA凝縮を目的として使用される、1ないし4本の、含窒素親水性側鎖を有するフラーレン誘導体またはその塩類を提供することで、上記課題の解決を図る。

【効果】 効果的にDNA凝縮を行うことができ、遺伝子治療等への応用も期待される。

【選択図】 図1

特平 10-058614

【書類名】 職権訂正データ  
【訂正書類】 特許願

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】

【識別番号】 597017258  
【住所又は居所】 東京都文京区本駒込 5-3-3-1001  
【氏名又は名称】 中村 栄一

【特許出願人】

【識別番号】 000005245  
【住所又は居所】 大阪府大阪市中央区道修町 3 丁目 4 番 7 号  
【氏名又は名称】 藤沢薬品工業株式会社

【代理人】

申請人

【識別番号】 100079670  
【住所又は居所】 大阪府大阪市淀川区加島 2-1-6 藤沢薬品工業  
株式会社内  
【氏名又は名称】 関 英男



出願人履歴情報

識別番号

[597017258]

1. 変更年月日 1997年 2月 6日

[変更理由] 新規登録

住 所 東京都文京区本駒込5-3-3-1001

氏 名 中村 栄一

特平10-058614

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000005245]

1. 変更年月日 1990年 8月17日

[変更理由] 新規登録

住 所 大阪府大阪市中央区道修町3丁目4番7号

氏 名 藤沢薬品工業株式会社